

GUSTAVO HAUBER GAMEIRO

***O EFEITO DO ETANOL SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA
PELA INJEÇÃO DE FORMALINA NA ATM DE RATOS***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia, Área de Concentração em
Fisiologia Oral.

**PIRACICABA
2004**

GUSTAVO HAUBER GAMEIRO

***O EFEITO DO ETANOL SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA
PELA INJEÇÃO DE FORMALINA NA ATM DE RATOS***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Fisiologia Oral.

Orientadora: Prof^ª Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada

Prof^ª Dra. Maria Cristina Volpato

**PIRACICABA
2004**

Ficha Catalográfica

G145e	<p>Gameiro, Gustavo Hauber.</p> <p>O efeito do etanol sobre a nocicepção induzida pela injeção de formalina na ATM de ratos. / Gustavo Hauber Gameiro. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.</p> <p>ix, 51f. : il.</p> <p>Orientadora : Prof^a Dr^a Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Analgesia. 2. Tolerância. I. Veiga, Maria Cecília Ferraz de Arruda. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 28 de Janeiro de 2004, considerou o candidato GUSTAVO HAUBER GAMEIRO aprovado.

1. Prof. Dr. MARIA CECILIA FERRAZ ARRUDA VEIGA

2. Prof. Dr. CARLOS AMÍLCAR PARADA

3. Profa. Dra. MARIA CRISTINA VOLPATO

*Dedico este trabalho aos meus pais
João Luis e Mara, pelo apoio e
amor que me sustentaram em todos
os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar meus passos e tornar possível mais esta conquista.

Agradeço à minha orientadora, Professora Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga. A dedicação, amizade e atenção dispensada a mim e aos seus orientados, assim como sua determinação para o trabalho constituem um exemplo que procurarei seguir durante toda a minha vida.

Sou grato especialmente aos meus amigos Luciano José, Leonardo Bonjardim, Rodrigo Rodrigues, Ana Paula Tanno, Paula Castelo e Tatiana Cunha. Considero essas amizades as maiores bênçãos que recebi em Piracicaba.

Agradeço, especialmente, à Annicele da Silva Andrade, pelo carinho, amor e amizade, sempre presentes, nos bons e maus momentos.

Agradeço aos colegas de doutorado Franco Arsati e Luciane Rodrigues, pela amizade e companheirismo.

Agradeço aos colegas de mestrado Mariana Franco, Maria Cláudia Oliveira, Juliana Clemente, Elisabeth Ting e Fabio José. Juntos, compartilhamos diversas experiências importantes para o nosso crescimento. Também sou grato aos companheiros Marcos Pinheiro, Ramiro Murata, Giovana Pecharki e Cristiana Tengan.

Aos professores que participaram ativamente das diversas etapas até a conclusão do meu mestrado: Cinthia Pereira Machado Tabchoury, Eduardo Dias de Andrade, Thales Rocha de Mattos Filho, Carlos Amílcar Parada e Maria Cristina Volpato. O conhecimento e experiência transmitidos por eles jamais serão esquecidos.

Agradeço, em especial, à Professora Maria Beatriz Duarte Gavião, por ter me dado a oportunidade de estagiar na área de odontopediatria, onde pude dar continuidade à prática da odontologia. Agradeço também à Renata Groppo, que sempre teve paciência para me ajudar a confeccionar os aparelhos ortodônticos.

Agradeço ao Professor Jorge Valério, pelas aulas de inglês e pela parceria nos momentos de descontração da turma no “John’s Bar”.

Ao senhor Carlos Alberto Feliciano, pelo companheirismo e pela assistência técnica nos laboratórios da fisiologia.

Às secretárias Eliete Riguetto, Maria Elisa e Erica Alessandra, pela boa vontade com que sempre me atenderam. O apoio dessas profissionais e amigas sempre foi fundamental para a realização das pesquisas dos alunos no Departamento.

Agradeço à FOP-Unicamp e, em especial, ao Departamento de Ciências Fisiológicas, por me darem esta oportunidade e todas as condições necessárias para que este trabalho fosse realizado.

Finalmente, agradeço com muito carinho aos meus familiares, meus pais João Luís e Mara, meus irmãos Augusto e Paula, minha cunhada Mariana, minha querida avó Rosália e à Maria Luíza.

Ao CNPq, CAPES e ao FAEP, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes.

É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto as cheias a baixam para a terra, sua mãe.

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 NEUROBIOLOGIA DA DOR.....	5
2.2 MECANISMOS DE AÇÃO DO ETANOL	10
2.3 INFLUÊNCIA DO ETANOL NO PROCESSAMENTO DA DOR	14
3 PROPOSIÇÃO	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO.....	34
7 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS.....	49
APÊNDICE	50

RESUMO

Embora a capacidade do etanol em alterar a sensibilidade nociceptiva tenha sido demonstrada em vários trabalhos, os testes nociceptivos utilizados nesses estudos foram realizados somente em tecidos superficiais. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi demonstrar os efeitos agudo, crônico e de retirada do etanol sobre as respostas comportamentais de nocicepção provocadas pela injeção de formalina na articulação temporomandibular (ATM) de ratos. Foi avaliada a soma (em segundos) dos comportamentos nociceptivos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça durante 45 minutos. No experimento 1, solução salina (NaCl 0,9%) ou etanol (2,5 g/Kg) foram administrados i.p. 15 minutos antes da administração de formalina 1,5% (50 µL) na ATM. Os animais pré-tratados com etanol mostraram uma diminuição nas respostas comportamentais nociceptivas. No experimento 2, os animais receberam uma solução de etanol 6,5% *ad libitum* ou água comum para beber durante 4 e 10 dias, antes da realização do teste da formalina na ATM. No grupo tratado por 4 dias observou-se analgesia significativa ao teste da formalina na ATM, enquanto que no grupo tratado por 10 dias esse efeito analgésico não ocorreu, demonstrando o desenvolvimento de tolerância aos efeitos analgésicos do etanol. O efeito de retirada foi avaliado 12 horas após a remoção do etanol (6,5% por 10 dias), sendo verificado o aparecimento de hiperalgesia durante o teste da formalina na ATM. Para verificar a interação entre o etanol e a morfina, os animais foram submetidos ao regime crônico de etanol (6,5 % por 10 dias) enquanto o grupo controle recebeu água comum para beber. Após esse período, foi administrada morfina (10 mg/Kg i.p.) 30 minutos antes da realização do teste da formalina na ATM. A morfina teve o mesmo efeito analgésico nos 2 grupos, demonstrando que o tratamento com etanol não foi capaz de alterar a potência analgésica da morfina, ou seja, não houve desenvolvimento de tolerância-cruzada. Os resultados mostraram que o etanol é capaz de alterar as respostas nociceptivas relacionadas à dor proveniente de tecidos profundos, como a ATM, e a ausência de interação entre o etanol e a morfina indica que a analgesia induzida pelo etanol é mediada por mecanismos não-opioides. Os dados foram analisados utilizando-se o teste –t e One-Way, (ANOVA).

ABSTRACT

Although the capacity of ethanol to alter nociception has been demonstrated in previous research, the nociceptive tests used in these studies were performed only in superficial tissues. Thus, the aim of this study was to evaluate the acute, chronic and ethanol withdrawal effects on nociceptive behavioral responses induced by the injection of formalin into the temporomandibular joint (TMJ) region of rats. The sum (in seconds) of nociceptive behaviors characterized by rubbing the orofacial region and flinching the head was quantified during 45 minutes. In experiment 1, rats were injected with ethanol (2.5 g/Kg, IP) or an equal volume of saline 15 min before the administration of formalin (1.5 %; 50 μ L) into the TMJ. Rats pretreated with ethanol showed a decrease in nociceptive behavioral responses. In experiment 2, rats were given an ethanol solution (6.5 %) *ad libitum* or tap water to drink for 4 and 10 days. On day 4, the animals (ethanol group) showed amounts of analgesia when submitted to the TMJ formalin test, whereas the group treated for 10 days didn't show this effect, revealing the development of tolerance to ethanol antinociceptive effects. The withdrawal effect was evaluated 12 hours after removal of ethanol (6.5% for 10 days), being verified hyperalgesia in the formalin test. To verify the interaction between ethanol and morphine, animals were submitted to chronic regimen of ethanol (6.5% for 10 days) and the control group was given tap water to drink. After this period, morphine (10 mg/Kg) was administrated 30 minutes before the TMJ formalin test. Morphine had the same analgesic effect in both groups, showing that the treatment with ethanol was not able to alter the analgesic potency of morphine – there wasn't development of cross tolerance. The results showed that ethanol can affect nociceptive behavioral responses related to pain from deep tissues, like the TMJ, and the absence of interaction between ethanol and morphine suggest that ethanol-induced analgesia is mediated by nonopioid mechanisms. Data were analyzed using t-test and One-Way (ANOVA).

1 INTRODUÇÃO

As bebidas alcoólicas têm sido utilizadas desde o início da história. Na Idade Média, quando os árabes introduziram a técnica da destilação na Europa, os alquimistas acreditaram que o etanol era o tão procurado elixir da vida, e este foi então tido como remédio para praticamente todas as doenças. Atualmente reconhece-se que o valor terapêutico do etanol é extremamente limitado, e além disso, a sua ingestão crônica é um importante problema clínico e social (Hobbs *et al.*, 1996).

Segundo Schuckit (1989), citado por O'Brien (1996), cerca de 70% dos adultos norte-americanos ocasionalmente consomem etanol, e Vaillant *et al.* (1999) relatam que o etanol provoca problemas na vida de pelo menos 3 a 10 % da população americana. No Brasil, constatou-se que o consumo freqüente de álcool é uma realidade para 15 % dos estudantes brasileiros (Galduróz *et al.*, 1997), citados por Brasil (2002)¹.

Apesar dessa alta prevalência, a literatura especializada sobre as ações do etanol no organismo está repleta de controvérsias. Embora seja classificado como um depressor do sistema nervoso central, pois provoca sedação e sono, os efeitos iniciais do etanol geralmente são percebidos como estimulação devido a uma supressão dos sistemas inibitórios. Além disso, o uso repetido do etanol pode provocar tolerância, dependência física e sua retirada a síndrome de abstinência (O'Brien, 1996), o que dificulta ainda mais os estudos sobre a discriminação detalhada dos efeitos do etanol sobre diversas funções do organismo.

Em relação à dor, a maioria dos autores concorda que o etanol pode provocar alterações nos sistemas de nocicepção, isto é, nos sistemas capazes de detectar e reconhecer estímulos nocivos (Jorgensen & Hole, 1981; Pohorecky & Shah, 1987; Burkey *et al.*, 1994). Entretanto, não existem estudos sobre os efeitos do etanol nas respostas de dor provocadas por injúrias teciduais profundas. Ocorrem maiores distúrbios sensoriais nas condições dolorosas envolvendo tecidos profundos do que naquelas relacionadas a tecidos superficiais (Sessle & Hu, 1991). De fato, a inflamação da ATM é uma das patologias

¹ <http://www.saude.gov.br/Programas/mental/criar.htm#not4>

orofaciais que mais provoca alterações no sistema nervoso central (Iwata *et al.*, 1999).

Considerando que as respostas comportamentais provocadas pela injeção de formalina na ATM representam um modelo experimental confiável de dor orofacial profunda (Roveroni *et al.*, 2001), o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito agudo, crônico e de retirada do etanol sobre as respostas nociceptivas induzidas por esse teste, bem como verificar uma possível interação entre o etanol e o efeito analgésico da morfina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEUROBIOLOGIA DA DOR

Atualmente, a dor não pode mais ser considerada simplesmente uma sensação que reflete os aspectos sensório-discriminativos de um estímulo nocivo, tais como a qualidade, intensidade, localização e duração de um estímulo doloroso (Dubner, 1978). Hoje, a dor é conceituada como uma experiência multifatorial ou multidimensional, que pode ser modificada por influências cognitivas, emocionais e motivacionais relacionadas à vida das pessoas e às suas experiências passadas de dor (Sessle, 1986). Isto significa que quando um paciente procura um dentista reclamando de dor, o dentista não está lidando somente com um fenômeno sensorial envolvendo eventos neurais periféricos provocados por uma lesão física identificável, mas com a interação desses eventos com o sistema nervoso central do paciente. Em vista de diagnosticar e controlar a dor efetivamente, o clínico deve estar familiarizado com a complexidade do processo de transmissão e percepção da dor.

As terminações nervosas livres encontradas nos tecidos craniofaciais como pele, mucosa oral, ATM, polpa dental, periósteo, periodonto e músculos suprem a base periférica para a dor. Muitas terminações nervosas livres atuam como nociceptores, que são órgãos sensoriais especializados ou receptores que respondem a estímulos nocivos. A ativação desses, pode resultar na excitação da fibra nervosa aferente com a qual eles estão associados e na transmissão de informações sensoriais e discriminativas sobre as características espacial e temporal de um estímulo nocivo ao sistema nervoso central (SNC) (Sessle, 2000). As fibras responsáveis pela transmissão da dor são do tipo A-delta (mielinizadas) e fibras-C não mielinizadas. As primeiras transmitem a sensação de dor rápida, focal, bem localizada, enquanto as segundas transmitem a sensação de queimação, difusa e pobremente localizada da dor (Sessle, 1986).

Há ainda um outra fibra de grosso calibre e alta velocidade de condução denominada A-beta (mielinizada), por onde são conduzidas informações táteis e que está

envolvida no processo de modulação do estímulo doloroso (Aghabeigi, 1992; Lund *et al.*, 2002).

A maioria dos aferentes primários que inerva a região craniofacial tem seus corpos celulares no gânglio trigeminal (V), e se projetam centralmente para o complexo nuclear sensorial V do tronco encefálico, de onde podem ascender ou descender no trato espinhal V. Neste, eles dão origem a colaterais que terminam em uma ou mais subdivisões do complexo nuclear sensorial V e ativam neurônios de segunda ordem, dentro ou adjacentes a esse complexo V do tronco encefálico (Figura 1) (Lund *et al.*, 2002).

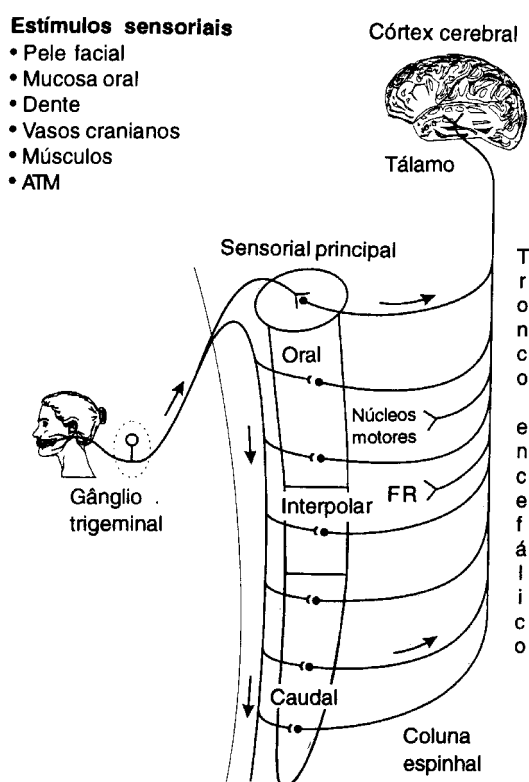


Figura 1 – Principal via somatossensorial da boca e face

Fonte: Lund *et al.*, 2002.

O complexo V do tronco encefálico pode ser subdividido em núcleo sensorial principal (NSP) e núcleo do trato espinhal (NTE). Este último é constituído por 3 subnúcleos: oral, interpolar e caudal (Sessle, 1996). O subnúcleo caudal tem sido especialmente implicado nos mecanismos nociceptivos trigeminais, sendo essa observação baseada tanto em dados clínicos (Sessle, 2000), como também em dados laboratoriais (Tsai *et al.*, 1999; Chiang *et al.*, 2002). De fato, suas semelhanças morfológicas e fisiológicas com o corno dorsal espinhal fizeram com que o subnúcleo caudal fosse designado como o corno dorsal medular (Gobel *et al.*, 1981)

O subnúcleo caudal possui dois tipos de neurônios nociceptivos: os específicos, que recebem impulsos das fibras C e A-delta e respondem somente a estímulos nocivos, e os convergentes ou multirreceptivos, que recebem aferências tanto das fibras do tipo A de pequeno e grande diâmetro, como também das fibras C e podem ser excitados por estímulos nocivos e não nocivos (p.ex. táteis). Os neurônios nociceptivos recebem aferências de diferentes tecidos, tais como a pele, mucosa, ATM, músculos da mastigação, língua e dura-máter, sendo essa extensiva convergência uma das possíveis explicações tanto para a localização imprecisa de estímulos dolorosos originados em tecidos profundos, como para a dor referida relacionada a esses tecidos (Sessle, 2002).

A função do subnúcleo caudal não é simplesmente agir como uma estação de retransmissão da informação nociceptiva, mas sim de colaborar com o processamento e modulação da sensação dolorosa, que será transmitida para centros cerebrais superiores e/ou para centros reflexos locais (Sessle, 1986). Muitos neurotransmissores estão envolvidos nesse processo de modulação da dor, alguns exercendo influências excitatórias sobre a transmissão nociceptiva (p.ex. substância P, N-methyl-D-aspartato), enquanto outras exercem principalmente influências inibitórias (p.ex. encefalina, ácido γ -aminobutírico, serotonina) através de mecanismos regulatórios pré-sinápticos ou pós-sinápticos (Sessle, 1996).

A modificação da transmissão somatossensorial pode ocorrer também nos níveis neuronais corticais e talâmicos. Entretanto, as mudanças nas informações ascendentes acontecem principalmente no complexo V do tronco encefálico. A intrincada organização de cada subdivisão desse complexo, junto com a variedade de estímulos e

interconexões de cada uma delas, suprem a base para as numerosas interações existentes entre os vários estímulos derivados dos tecidos periféricos (p.ex. inibição segmental) e das regiões intrínsecas cerebrais (p.ex. inibição descendente). Alterações nessas influências moduladoras são consideradas fatores contribuintes para as mudanças neuroplásticas, que ocorrem nas propriedades de resposta dos neurônios nociceptivos centrais, como resultado de um dano ou inflamação dos tecidos periféricos (Sessle, 1996).

Ao ocorrer uma lesão tecidual, como por exemplo na ATM, uma série de respostas são desencadeadas pelo organismo por intermédio da liberação coordenada de diversas classes de mediadores inflamatórios (p.ex. bradicinina, prostaglandinas, substância P, serotonina, histamina, fator de crescimento neural, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, entre outras). Essa “sopa” de mediadores será capaz de provocar uma série de alterações neuroplásticas periféricas e centrais (Dray, 1995; Swift *et al.*, 1998).

No tecido periférico inflamado, os mediadores podem ativar os nociceptores (p.ex. despolarização da membrana com condução do sinal até o SNC) ou sensibilizá-los. Alguns aferentes nociceptivos podem realmente estar “silenciosos” e não sensíveis a estímulos nocivos periféricos, a não ser que sejam sensibilizados por mediadores inflamatórios (Le Bars & Adam, 2002). Um nociceptor sensibilizado apresenta despolarização espontânea, limiar para despolarização reduzido e aumento das descargas após estímulos supralimiais. Esse processo é denominado sensibilização periférica e é o principal fator que contribui para os estados de alodínia, resposta dolorosa por estímulo não-nocivo e hiperalgesia, que é uma resposta aumentada perante estímulos que normalmente são dolorosos (Coderre *et al.*, 1993).

Semelhantemente, no SNC, o aumento da liberação dessas substâncias químicas nas sinapses entre as fibras periféricas e os neurônios do subnúcleo caudal, ou do corno dorsal da medula espinhal, podem promover um aumento na excitabilidade, no campo receptivo (porção do corpo que, quando estimulada no limiar, excita o neurônio) e na atividade espontânea desses neurônios, levando ao processo conhecido como sensibilização central (Sessle, 1995; Woolf, 1996). Relaciona-se a esse processo a hiperalgesia secundária e as manifestações de dor difusa e referida, associadas à injúria tecidual ou à inflamação de tecidos profundos (Sessle, 2002).

Não só a transmissão, mas também a percepção da sensação dolorosa representa um fenômeno bastante complexo. A dor é algumas vezes sentida na ausência de estimulação dos nociceptores. Um exemplo disso é a “ilusão da grelha térmica”, uma dor ilusória demonstrada em muitos museus de ciência. Quando as pessoas colocam suas mãos em uma grelha de metal de padrões intercalados, quente e frio, elas geralmente relatam uma sensação de dor por queimação (Craig & Bushnell, 1994). O fato de várias partes do cérebro serem ativadas quando uma pessoa sente dor reflete a natureza complexa da experiência (Figura 2).

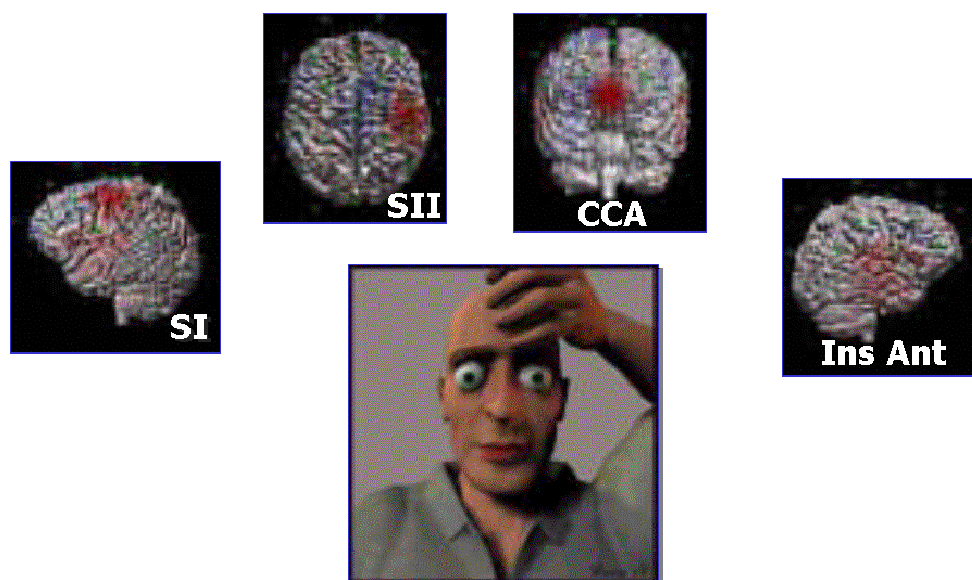


FIGURA 2 – Imagem de ressonância magnética funcional mostrando áreas de ativação relacionadas à dor. Essas áreas incluem os córtices cingulado anterior (CCA) e o insular anterior (Ins Ant) do lobo frontal e os córtices somatossensoriais primário e secundário do lobo parietal (SI e SII).

FONTE: Adaptado de LUND *et al.*, 2002.

O córtex insular parece ser importante para as respostas afetivas à dor por integrar a informação sensitiva com as memórias pregressas de dor. O córtex cingulado anterior está provavelmente envolvido em reações comportamentais e autônomas à dor, e

os córtices somatossensoriais primário e secundário são mais importantes para a discriminação dos estímulos nocivos (Lund *et al.*, 2002).

2.2. MECANISMOS DE AÇÃO DO ETANOL

O etanol foi amplamente utilizado para o alívio da dor nos tempos antigos, embora os seus mecanismos de ação não sejam ainda bem compreendidos (Figura 3). O etanol afeta diversas funções do sistema nervoso central, provocando analgesia, sedação, hipnose, distúrbio motor, distúrbio de memória, confusão, neurodegeneração, e/ou dependência (Deitrich *et al.*, 1989; Fadda & Rossetti, 1998). Antigamente acreditava-se que o etanol causava essas alterações por afetar proteínas de membrana não-seletivas, visto as perturbações induzidas pelo etanol na ordem dos lipídios de membrana (Deitrich *et al.*, 1989; Peoples *et al.*, 1996). Entretanto, os efeitos do etanol sobre os lipídios de membrana são muito pequenos quando se utiliza concentrações clínicas e farmacológicas relevantes (Deitrich *et al.*, 1989; Peoples *et al.*, 1996).



Figura 3 – Ilustração mostrando um “paciente” ingerindo etanol enquanto espera para ser atendido pelo “dentista” da época.

Fonte: Adaptado do Livro História Ilustrada da Odontologia.

Estudos recentes mostram que as funções de uma variedade de proteínas, tais como canais iônicos e enzimas, podem ser alteradas pelo etanol. É provável que os efeitos analgésicos do etanol sejam mediados por algumas dessas proteínas alvo (Figura 4).

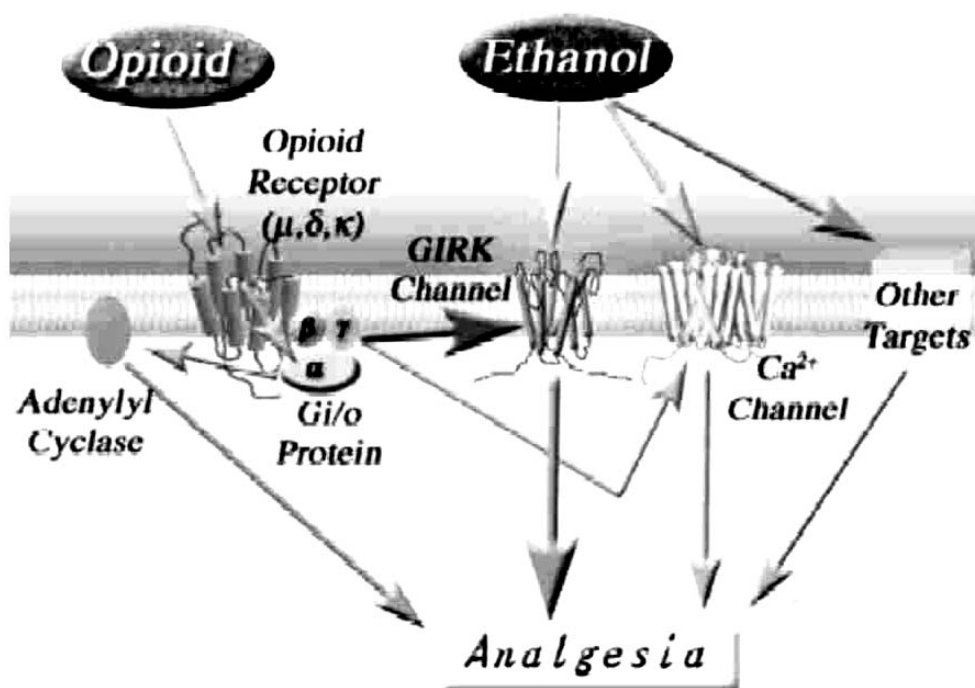


Figura 4 – Vias mediando a analgesia induzida por opióides e etanol.

Fonte: IKEDA *et al.*, 2002.

O etanol pode ativar diretamente os canais de potássio retificados intimamente associados à proteína G (GIRK). A ativação desses canais induz à hiperpolarização da membrana de neurônios via o efluxo de íons potássio, e o resultado é uma redução na excitabilidade neural (Ikeda *et al.*, 2002). Esses canais são encontrados nas regiões de modulação descendente da dor (p.ex. substância cinzenta periaquedutal, núcleo magno da rafe), e também em outros locais relacionados à modulação da dor, tais como a amígdala e o tálamo, portanto é possível que esses canais estejam envolvidos na analgesia induzida pelo etanol.

Estudos comportamentais (Kosten & Bombace, 2001), eletrofisiológicos (Lovinger *et al.*, 1989) e bioquímicos (Hoffman *et al.*, 1989) comprovaram que o etanol antagoniza os efeitos do glutamato sobre os receptores do tipo N-methyl-D-aspartato (NMDA). Estes receptores estão envolvidos na neurotransmissão excitatória e são importantes para a transmissão nociceptiva nas vias somatossensoriais ascendentes, particularmente nos estados de sensibilização central, que podem ser provocados por inflamação ou outras condições associadas com o aumento de estímulos aferentes de fibras-C para o SNC (Yaksh, 1989; Woolf & Thompson, 1991). Estes achados levam a crer que os antagonistas de NMDA poderiam ser úteis como analgésicos (Dubner & Basbaum, 1994; Sessle, 2000).

A ativação dos receptores do tipo GABA_A (ácido γ -aminobutírico) é potencializada pelo etanol (Mihic, 1999). O receptor para o GABA encontra-se associado ao canal de cloro e ao receptor de benzodiazepínicos, formando um complexo funcional. Quando o GABA se acopla ao seu receptor, promove o aumento na frequência de abertura dos canais de cloro, permitindo assim a passagem de maior quantidade do íon para o meio intracelular, tornando-o ainda mais negativo e promovendo assim, hiperpolarização neuronal (Fritschy & Brunig, 2003). Considerando que o etanol potencializa as funções desses receptores, a ingestão alcoólica poderá induzir um efeito sedativo em diversas partes do cérebro, tais como aquelas responsáveis pelo movimento, memória, respiração e percepção da dor.

Lovinger (1999) demonstrou que o etanol potencializa as respostas neuronais mediadas pelo receptor 5HT₃ (receptor serotoninérgico). Estes receptores localizam-se basicamente em interneurônios inibitórios (Tecott *et al.*, 1993), portanto a ação excitatória do etanol sobre esses canais parece estar envolvida na modulação (inibição) da informação dolorosa.

Recentemente, uma nova ação do etanol tem sido investigada. Foi provado que o etanol é capaz de inibir respostas mediadas pelos canais receptores de ATP, designados como receptores P2X (Li *et al.*, 1994; Weight *et al.*, 1999; Xiong *et al.*, 2000). Sendo o ATP uma molécula relacionada com a excitação da transmissão nociceptiva (Cook &

McCleskey, 2002), o bloqueio dos receptores de ATP pelo etanol poderia ser responsável, pelo menos em parte, pelas ações analgésicas do etanol.

Considerando que a maioria das moléculas que medeiam os efeitos do etanol são as mesmas associadas com a modulação da dor proveniente de tecidos profundos (Tabela 1), é possível supor que o etanol tenha alguma influência considerável no processamento da dor proveniente de injúrias teciduais profundas, como é o caso da inflamação da ATM provocada por injeção de formalina.

TABELA 1 - Moléculas que medeiam os efeitos do etanol

Moléculas	Função	Efeitos do etanol	Relação entre moléculas e modulação da dor (referências)
GIRK	Hiperpolarização da membrana	Ativação (analgesia)	Ikeda <i>et al.</i> , 2002
NMDA-R	Neurotransmissão excitatória	Inibição	Yu <i>et al.</i> , 1996
GABA _A -R	Neurotransmissão inibitória	Potencialização	Seo <i>et al.</i> , 2001
5HT-R (em interneurônios inibitórios)	Neurotransmissão excitatória	Potencialização	Garraway and Hochman, 2001
ATP-R	Neurotransmissão excitatória	Inibição	Hu <i>et al.</i> , 2002

GIRK: canais de potássio intimamente associados à proteína G; NMDA-R: receptor do tipo N-methyl-D-aspartato; GABA_A-R: receptor do ácido γ -amino butírico tipo A; 5HT-R: receptor do tipo 5-hidroxytriptamina; ATP-R: canal receptor para o ATP

2.3 INFLUÊNCIA DO ETANOL NO PROCESSAMENTO DA DOR

A analgesia induzida pelo etanol tem sido relatada tanto em humanos (Wolff *et al.*, 1942; Cutter & O'Farrel, 1987; Woodrow & Eltherington, 1988) como em animais (Brick *et al.*, 1976; Bass *et al.*, 1978; Jorgensen *et al.*, 1985; Pohorecky & Shah, 1987; Yirmiia & Taylor, 1989). Pesquisas anteriores provaram que a administração aguda de etanol é capaz de produzir um grau significativo de analgesia em vários ensaios nociceptivos, por exemplo, desvio da cauda (*tail-deflection* - Yirmiia & Taylor, 1989),

retirada da cauda (*tail-flick* - Jorgensen & Hole, 1981; Holloway *et al.*, 1993), choque nas patas (*foot-shock* – Friedman *et al.*, 1980), teste da formalina (Franklin & Abbott, 1993) e teste do estresse por natação (Mogil *et al.*, 1993). A administração crônica de etanol também produz antinocicepção, a qual é seguida pelo desenvolvimento de tolerância a esses efeitos antinociceptivos, caso a ingestão de etanol se prolongue por mais de 10 dias (Gatch & Lal, 1999).

Recentemente, Gatch & Lal (1999), através de um ensaio de nocicepção que avalia o movimento rápido da cauda ao calor radiante (*tail-flick*) em ratos, concluíram que: (1) o etanol produz antinocicepção quando administrado de forma aguda ou crônica; (2) tolerância aos efeitos antinociceptivos ocorre durante a administração crônica; e (3) a retirada do etanol induz à hiperalgesia, que é revertida pelo próprio etanol.

Bell *et al.* (1998), utilizando o teste da placa quente em ratos, constataram que a administração aguda de etanol foi capaz de provocar um estado de analgesia significativa. Verificaram também tolerância à analgesia induzida pelo etanol e ausência de tolerância-cruzada à analgesia induzida pela morfina, sugerindo que os efeitos analgésicos do etanol são mediados por mecanismos não-opioides.

Por outro lado, o estudo de Shah *et al.* (1997) analisou as respostas nociceptivas induzidas pelo *tail-flick* em camundongos submetidos a tratamentos agudo e crônico com etanol, não observando o desenvolvimento de antinocicepção frente aos dois tipos de tratamento. Porém, o consumo crônico de etanol diminui a potência analgésica da morfina nos animais expostos a uma dose de etanol de 6-7% durante sete dias. Como esse efeito não foi causado por alterações na densidade, afinidade e expressão genética dos receptores opioides, o mecanismo desse efeito ainda não está esclarecido.

O estudo de Duttaroy *et al.* (1998) também mostrou que camundongos submetidos à administrações aguda e crônica de etanol não tiveram alterações nas respostas nociceptivas induzidas por um teste de nocicepção (*tail-flick*). Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que o acesso forçado ao etanol 7% por 24 horas, foi suficiente para reduzir a potência analgésica da morfina, e essa redução pode ter sido mediada por mecanismos intracelulares acoplados à proteína-G.

A razão para algumas discrepâncias entre os resultados dos trabalhos citados acima se deve principalmente aos diferentes tipos de animais utilizados nos experimentos. Por exemplo, Fidecka *et al.*, 1986, demonstraram que a tolerância à analgesia induzida pelo etanol era acompanhada por tolerância-cruzada à analgesia induzida pela morfina em camundongos, mas não em ratos. Outro fator importante é o tipo de protocolo experimental utilizado para testar a analgesia e para induzir tolerância, visto que muitos “fatores ambientais” (p.ex. manipulação, injeção, sala do experimento) são capazes de alterar os resultados dos procedimentos experimentais (Bell *et al.*, 1998).

Um assunto bastante discutido atualmente são os efeitos ansiogênicos da retirada do etanol (Gatch *et al.*, 2000, Doremus *et al.*, 2003), pois é grande a incidência dos efeitos da síndrome de abstinência em pacientes alcoólatras que tentam abandonar o vício. Entretanto, o desconforto físico provocado pela retirada do etanol tem recebido pouca atenção. Gatch & Lal (1999) relataram que a retirada do etanol foi capaz de induzir hiperalgesia no teste do *tail-flick* em ratos.

Em todos trabalhos já citados, os testes nociceptivos utilizados para avaliar a analgesia induzida pelo etanol foram realizados somente em tecidos superficiais. Faltam estudos sobre o efeito do etanol em condições dolorosas profundas, que possuem características muito diferentes daquelas provocadas por estímulos nocivos superficiais. Existem mais distúrbios sensoriais nas condições dolorosas envolvendo tecidos profundos do que nas condições dolorosas superficiais (Sessle & Hu, 1991). Estímulos nocivos profundos, provenientes da região orofacial, são muito mais eficientes em induzir alterações neuroplásticas (Yu *et al.*, 1993) e expressão de proteína Fos, quando comparados com estímulos superficiais. Além disso, muitas dores craniofaciais profundas, como a dor na ATM, estão associadas com manifestações de dor difusa e referida (Sessle & Hu, 1991). De fato, a inflamação da ATM é a condição orofacial que mais provoca alterações no SNC (Iwata *et al.*, 1999), e por isso ainda é considerada uma patologia de difícil diagnóstico e tratamento.

3 PROPOSIÇÃO

Diante da falta de estudos sobre os efeitos do etanol em condições dolorosas profundas, como a dor na ATM, propusemo-nos no presente trabalho, utilizando o teste da formalina na ATM de ratos a:

- 1- Verificar o efeito da administração aguda e crônica do etanol sobre a nocicepção.
- 2- Verificar o possível desenvolvimento de tolerância e o efeito da retirada do etanol nos animais submetidos a esse teste.
- 3- Avaliar a interação entre o etanol e a morfina nas respostas comportamentais nociceptivas.

4 MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 ANIMAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados 54 ratos machos Wistar, com 2-3 meses, pesando em média 250 gramas, provenientes do Centro Multi-institucional de Bioterismo-Cemib, Unicamp. Durante o período experimental (de 4 a 10 dias), os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em sala climatizada (20-24° C) e com ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes ascendendo as 6h:00). A dieta líquida foi oferecida *ad libitum* e a ração foi dada na quantidade de 22 g/dia. O peso corporal dos animais e a quantidade de consumo de líquido (água ou etanol) por gaiola foram registrados diariamente.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliar os efeitos agudo, crônico e de retirada do etanol sobre a sensibilidade nociceptiva da ATM, foram realizados os seguintes grupos experimentais:

Teste Agudo:

- Os animais receberam uma injeção i.p. de solução salina (NaCl – 0,9%) ou etanol (2,5 g/Kg) (Bell, 1998) em um volume de 0,83 ml/100 g, 15 minutos antes da administração de formalina 1,5% (50 µL) na ATM e análise comportamental – Grupos I (n=6) e II (n=6). Os animais permaneceram em gaiolas individuais por um período de 4 dias antes da realização do teste da formalina.

Teste Crônico:

- Foi oferecido etanol (6,5%) na água de beber durante 4 ou 10 dias (Gatch & Lal, 1999), antes da administração de formalina 1,5% (50 µL) na ATM de ratos– Grupos IV (n=6) e VI (n=6). As concentrações de etanol no sangue permanecem elevadas quando este protocolo é utilizado (Shah *et al.*, 1997). Os respectivos grupos controles receberam água pura para beber e também permaneceram em gaiolas individuais por um período de 4 ou 10 dias – Grupos III (n=6) e V (n=6). Os períodos de 4 e 10 dias foram utilizados porque

Gatch & Lal (1999) demonstraram que o pico do efeito analgésico do etanol ocorreu no quarto dia, enquanto o efeito de tolerância foi observado dez dias após a ingestão de etanol.

Efeito de Retirada:

- Para verificar o efeito de retirada do etanol na sensibilidade nociceptiva ao teste da formalina na ATM de ratos, foi oferecido etanol (6,5%) na água de beber por 10 dias (Gatch, 1999). A seguir foi oferecido água pura, e 12 horas após, a formalina 1,5% (50 µL) foi administrada na ATM – Grupo VII (n=6).

Tolerância ao etanol e interação com a morfina:

- Para verificar o possível desenvolvimento de tolerância e a interação entre o etanol e a morfina na nocicepção, foram realizados os seguintes grupos experimentais:

- Os animais foram submetidos ao regime crônico de etanol (6,5% por 10 dias) e o grupo controle recebeu água comum para beber. Após esse período, foi administrado morfina 10 mg/Kg i.p. (Bell *et al.* 1998) 30 minutos antes da realização do teste da formalina na ATM [Grupos VIII e IX (n=6/experimento)].

4.3 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

As sessões de testes foram realizadas durante a fase clara entre 07h:00 e 12h:00 em uma sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida à 23 ± 2 ° C (Rosland, 1991). Durante os testes comportamentais os ratos não tiveram acesso à água ou à comida. Para minimizar o estresse durante as sessões experimentais, os animais foram previamente manipulados pelo pesquisador por um período mínimo de 7 dias.

Os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes propostas pelo comitê para Pesquisa e Ética da Associação Internacional para o estudo da dor em animais conscientes (Zimmermann, 1983). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, Instituto de Biologia – UNICAMP, protocolo no 371-1, em maio de 2002 (ANEXO 1).

Para a análise comportamental foi utilizada uma câmara de observação (30cm x 30cm x 30 cm) com base e laterais espelhadas e frente de vidro (Figura 5). Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na câmara por 10 minutos para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse.

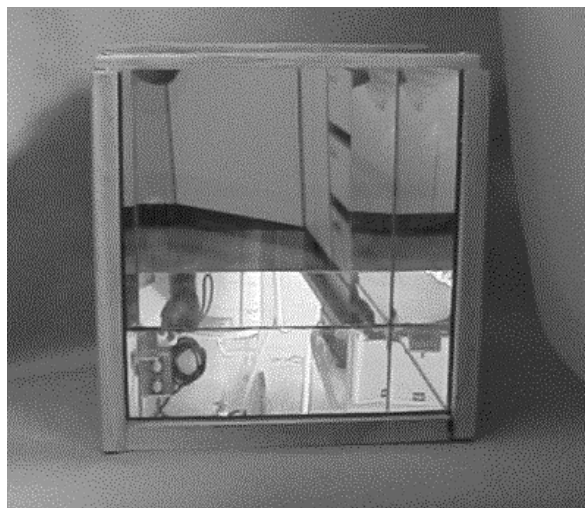


Figura 5 - Câmara de observação utilizada para a análise comportamental no teste da formalina na ATM.

Após esse período, o animal era removido da câmara e anestesiado rapidamente por inalação de halotano. Para administração de formalina na região da ATM esquerda foi utilizada uma agulha de calibre 30 conectada a uma seringa Hamilton (50 μ L) por um tubo de polietileno P₅₀. A borda pósterio-inferior do arco zigomático era palpada e a agulha inserida na porção inferior da mesma, sendo avançada em direção anterior até contactar a região pósterio-lateral do côndilo (Figura 6).



Figura 6 – Local de punção para a administração de formalina.

Logo após a injeção, o animal era recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais nociceptivas caracterizadas pelos atos de coçar a região orofacial (segundos) e levantar rapidamente a cabeça (número de vezes) foram quantificadas por 45 minutos (15 blocos de 3 minutos) com o auxílio de um cronômetro e um contador de células, respectivamente (Figura 7).



Figura 7 – Cronômetro e contador de células utilizados para a quantificação dos comportamentos nociceptivos.

Os comportamentos nociceptivos induzidos pela formalina na ATM foram analisados conjuntamente, pela soma do período de tempo que os animais apresentaram o

comportamento de coçar a região orofacial (CO), com o número de vezes que os animais levantaram rapidamente a cabeça (LC) ao longo do período de observação. Para a soma dos comportamentos foi determinado que cada ato de levantar rapidamente a cabeça (LC) correspondia a 1 segundo (Roveroni *et al.*, 2001).

As análises comportamentais foram realizadas por um pesquisador que não tinha conhecimento dos tratamentos que foram instituídos (estudo cego).

4.4 CONFIRMAÇÃO DO LOCAL DE APLICAÇÃO DA FORMALINA

Como procedimento de rotina, o sítio de aplicação da formalina era confirmado *pós-mortem* através do indicador de edema, caracterizado pelo extravasamento plasmático do corante Azul de Evans (1%), administrado endovenosamente (0,4 ml), sob anestesia com cloridrato de xilazina (2%; 0,05 ml/100g) e de ketamina (0,1%; 0,1 ml/100g), 10 minutos antes do animal ser sacrificado e perfundido com salina. Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas (Hass, *et al.*, 1991), o local da aplicação da injeção pode ser identificado visualmente.

4.5 SOLUÇÕES UTILIZADAS

- Formalina 1,5%: consiste na diluição de formaldeído a 37% em NaCl 0,9%.
 - Solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) – HALEXISTAR.
 - Formaldeído a 37% - SIGMA .
- Etanol 99,5% diluído em água comum, na concentração de 6,5%.
 - Etanol absoluto – PANREAC.
- Etanol 99,5% diluído em NaCl 0,9%, na concentração de 30%, na dose de 2,5 g/Kg em um volume de 0,83 ml/100g.
 - Etanol absoluto – PANREAC.
- Morfina – 1ml de sulfato de morfina diluído em 9 ml de NaCl 0,9%, na dose de 10mg/Kg.
 - Sulfato de morfina: Dimorf (10mg/ml) – CRISTÁLIA.
 - Solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) – HALEXISTAR.

- Ketamina (0,1%) em um volume de 0,1ml/100g.
→ Dopalen - AGRIBRANDS.
- Xilazina (2%) em um volume de 0,05ml/100g.
→ Rompun - BAYER.
- Halotano – CRISTÁLIA.
- Azul de Evans dissolvido em NaCl 0,9%, na concentração de 1%.
→ Azul de Evans – SIGMA.
→ Solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) – HALEXISTAR.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando-se o teste-t e o teste One-Way, análise de variância (ANOVA). Comparações múltiplas foram realizadas aplicando-se o teste de TUKEY. Para todos os testes o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. O peso corporal e o consumo de líquidos foram analisados pelo teste ANOVA para medidas repetidas e regressão polinomial. As respostas comportamentais nociceptivas, caracterizadas pela exacerbação do ato de coçar a região orofacial (CO) e pelo ato de levantar rapidamente a cabeça (LC), utilizadas como índice de dor orofacial para o teste da formalina na ATM de ratos, foram analisadas em conjunto, pela soma das mesmas. Os dados são apresentados pela média \pm Desvio Padrão. O programa utilizado para a realização dos cálculos estatísticos foi o SAS (version 8.2 for windows) by Institute Inc., Cary, NC, USA-licensed to Universidade Estadual de Campinas.

5 RESULTADOS

5.1 REGISTRO DO PESO CORPORAL E DO CONSUMO DE LÍQUIDOS (ÁGUA OU ETANOL)

As tabelas 1A e 1B e figuras 1A e 1B mostram os registros do peso corporal e da ingestão de líquidos (água ou etanol 6,5%) ao longo de um período de 4 dias. Embora tenha ocorrido um aumento significativo no peso corporal ao longo dos dias ($F=18,06$, $p<0,0001$), não houve diferença estatística entre os grupos tratado e controle ($F=0,01$, $p=0,9095$) e nem interação significativa entre dias e tratamento ($F=1,73$, $p=0,1825$). Não houve também efeito do tratamento com etanol no consumo de líquido ($F=2,29$, $p=0,1613$) e nem interação significativa entre dias e tratamento ($F=0,11$, $p=0,9562$).

Tabela 1A. Registro do peso corporal ao longo de 4 dias.

Peso corporal (g) – Média \pm DP			
Dias	Grupo Água	Grupo Etanol	N
1	236,5 \pm 22,3	239,8 \pm 12,3	6
2	238,0 \pm 20,5	241,0 \pm 8,5	6
3	245,0 \pm 20,0	246,7 \pm 11,9	6
4	250,7 \pm 22,2	247,2 \pm 12,9	6

Tabela 1B. Registro do consumo de líquidos ao longo de 4 dias.

Consumo de líquido (ml/dia) – Média \pm DP			
Dias	Grupo Água	Grupo Etanol	N
1	45,0 \pm 15,2	35,0 \pm 15,5	6
2	44,1 \pm 03,7	40,0 \pm 17,3	6
3	47,5 \pm 19,2	42,5 \pm 08,8	6
4	50,8 \pm 18,0	47,5 \pm 17,5	6

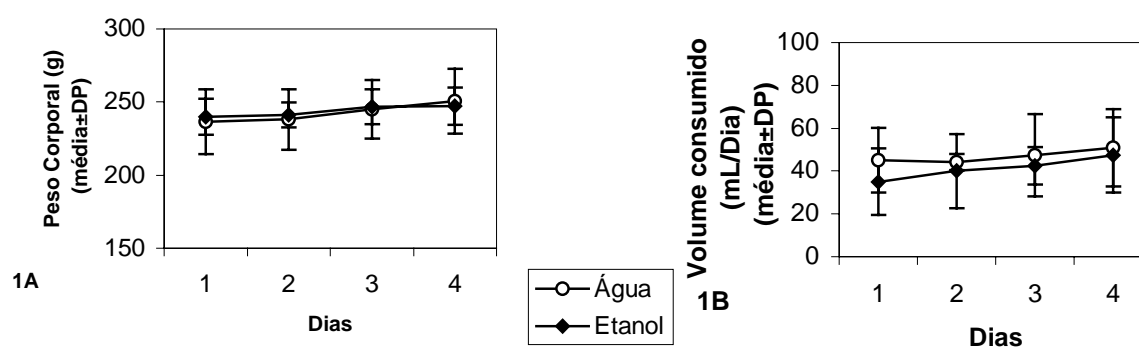


Figura 1. Efeito da ingestão de etanol sobre o peso corporal e consumo de líquido. Os ratos tiveram acesso (24h/dia) à água ou etanol (6,5% v/v) por 4 dias. **1A**- média \pm DP do peso corporal diário ($N=6$ /grupo). **1B**- Quantidade de água ou etanol consumida (mL/dia).

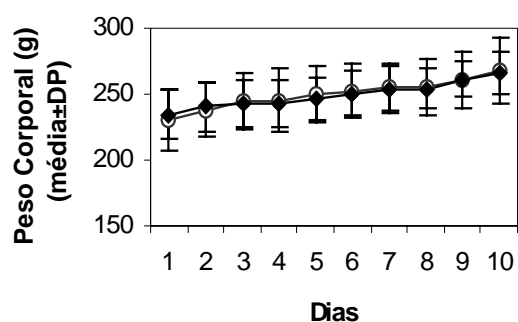
As tabelas 2A e 2B e figuras 2A e 2B mostram os registros do peso corporal e da ingestão de líquidos (água ou etanol 6,5%) ao longo de um período de 10 dias. Embora tenha ocorrido um aumento significativo no peso corporal ao longo dos dias ($F=79,06$, $p<0,0001$), não houve diferença estatística entre os grupos tratado e controle ($F=0$, $p=0,9533$) e nem interação significativa entre dias e tratamento ($F=0,86$, $p=0,5633$). Não houve também efeito do tratamento com etanol no consumo de líquido ($F=0,59$, $p=0,4585$) e nem interação significativa entre dias e tratamento ($F=0,21$, $p=0,9930$).

Tabela 2A. Registro do peso corporal ao longo de 10 dias.

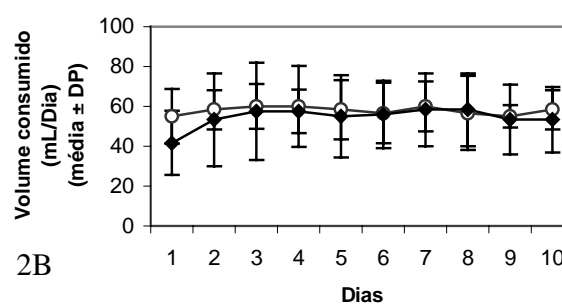
Peso corporal (g) – Média \pm DP			
Dias	Grupo Água	Grupo Etanol	N
1	231,2 \pm 23,4	234,5 \pm 19,0	6
2	237,8 \pm 20,7	240,3 \pm 18,8	6
3	244,5 \pm 22,2	243,2 \pm 18,2	6
4	245,0 \pm 23,9	243,0 \pm 18,5	6
5	249,5 \pm 21,6	246,3 \pm 16,2	6
6	252,3 \pm 20,5	250,3 \pm 16,9	6
7	255,2 \pm 18,7	254,3 \pm 16,8	6
8	255,7 \pm 21,9	254,3 \pm 15,6	6
9	261,0 \pm 20,9	261,5 \pm 13,8	6
10	267,7 \pm 24,4	265,3 \pm 16,1	6

Tabela 2B. Registro do consumo de líquidos ao longo de 10 dias.

Peso corporal (g) – Média ± DP			
Dias	Grupo Água	Grupo Etanol	N
1	55,0 ± 13,8	41,7 ± 16,0	6
2	58,3 ± 09,8	53,3 ± 23,4	6
3	60,0 ± 11,4	57,5 ± 24,4	6
4	60,0 ± 20,3	57,5 ± 10,8	6
5	58,3 ± 14,7	55,0 ± 20,7	6
6	56,7 ± 15,1	55,8 ± 16,9	6
7	60,0 ± 12,7	58,3 ± 18,4	6
8	56,7 ± 18,6	58,3 ± 18,4	6
9	55,0 ± 05,5	53,3 ± 17,5	6
10	58,3 ± 09,8	53,3 ± 16,3	6



2A



2B

Figura 2. Efeito da ingestão de etanol sobre o peso corporal e consumo de líquido. Os ratos tiveram acesso (24h/dia) à água ou etanol (6,5% v/v) por 10 dias. **2A-** média ± DP do peso corporal diário ($N=6$ /grupo). **2B-** Quantidade de água ou etanol consumida (mL/dia).

5.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ETANOL (2,5 g/Kg i.p.) SOBRE A SOMA DOS COMPORTAMENTOS NOCICEPTIVOS (COÇAR A REGIÃO OROFACIAL + LEVANTAR RAPIDAMENTE A CABEÇA)

A administração aguda de etanol (2,5 g/Kg i.p.) produziu analgesia significativa nos ratos submetidos ao teste da formalina na ATM. A redução nas respostas comportamentais nociceptivas foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$, teste- t ; Tabela 3 e Figura 3) quando o grupo controle foi comparado ao grupo teste.

Tabela 3. Soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça no teste da formalina após injeção de etanol ou salina ($N=6$ /grupo/experimento). Médias na vertical com letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste- t .

6/Grupo	Soma (CO + LC) – Média \pm DP
Salina	228,0 \pm 45,4 A
Etanol	115,9 \pm 35,5 B

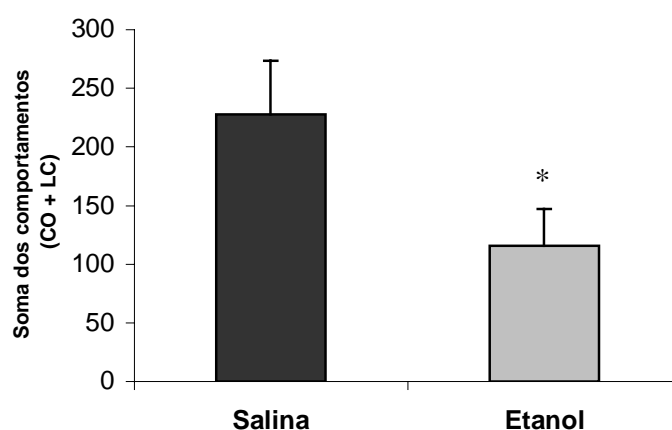


Figura 3. Efeito da administração aguda de etanol (2,5 g/Kg i.p.) ou salina sobre a soma dos comportamentos nociceptivos. Cada coluna representa a média \pm DP. * indica diferença estatística significativa entre os grupos I e II ($p < 0,001$, teste- t).

5.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ETANOL (6,5% POR 4 DIAS) SOBRE A SOMA DOS COMPORTAMENTOS NOCICEPTIVOS (COÇAR A REGIÃO OROFACIAL + LEVANTAR RAPIDAMENTE A CABEÇA)

Os efeitos antinociceptivos do etanol 6,5% foram observados no quarto dia de exposição à solução de etanol. A redução nas respostas nociceptivas foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$, teste- t ; Tabela 4 e Figura 4) quando o grupo controle foi comparado ao grupo experimental.

Tabela 4. Soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça no teste da formalina após ingestão crônica de etanol (6,5% por 4 dias) ou água comum ($N=6$ /grupo/experimento). Médias na vertical com letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste- t .

6/Grupo	Soma (CO + LC) – Média \pm DP
Água	219,5 \pm 40,1 A
Etanol	122,4 \pm 45,5 B

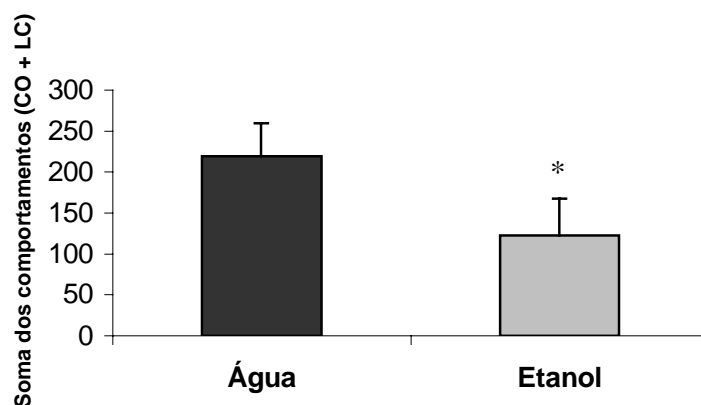


Figura 4. Efeito da ingestão crônica de etanol (6,5% por 4 dias) ou água comum sobre a soma dos comportamentos nociceptivos. Cada coluna representa a média \pm DP. * indica diferença estatística significativa entre os grupos III e IV ($p < 0,001$, teste- t).

5.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ETANOL (6,5% POR 10 DIAS) SOBRE A SOMA DOS COMPORTAMENTOS NOCICEPTIVOS (TESTE DE TOLERÂNCIA)

No dia 10, a soma dos comportamentos nociceptivos no teste da formalina na ATM não foi estatisticamente diferente entre o grupo controle vs. grupo teste, revelando que houve desenvolvimento de tolerância aos efeitos antinociceptivos do etanol ($p=0,98$, teste- t ; Tabela 5 e Figura 5).

Tabela 5. Soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça no teste da formalina após ingestão crônica de etanol (6,5% por 10 dias) ou água comum ($N=6$ /grupo/experimento). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,98$, teste- t).

6/Grupo	Soma (CO + LC) – Média \pm DP
Água	171,1 \pm 39,4
Etanol	170,7 \pm 43,2

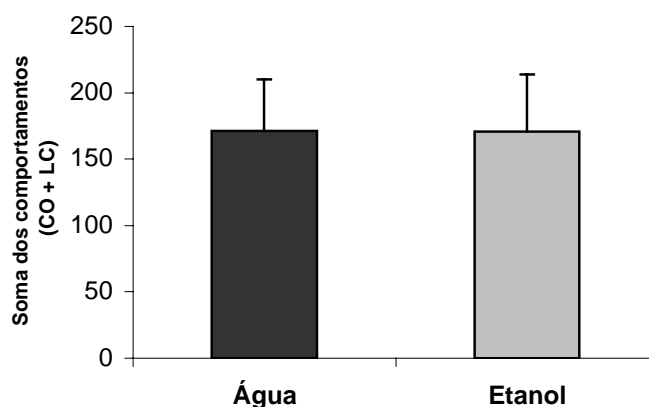


Figura 5. Efeito da ingestão crônica de etanol (6,5% por 10 dias) ou água comum sobre a soma dos comportamentos nociceptivos. Cada coluna representa a média \pm DP. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos V e VI ($p=0,98$, teste- t).

5.5 EFEITO DA RETIRADA DO ETANOL (6,5% POR 10 DIAS) SOBRE A SOMA DOS COMPORTAMENTOS NOCICEPTIVOS (COÇAR A REGIÃO OROFACIAL + LEVANTAR RAPIDAMENTE A CABEÇA)

A retirada do etanol produziu um grau significativo de hiperalgesia nos ratos submetidos ao teste da formalina na ATM. O teste foi realizado 12 horas após a remoção da solução de etanol (6,5% por 10 dias). O aumento nas respostas comportamentais nociceptivas foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$, teste- t ; Tabela 6 e Figura 6) quando o grupo da retirada foi comparado com o grupo da água e com o grupo do etanol.

Tabela 6. Soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça no teste da formalina 10 dias após de ingestão de água, etanol ou 12 horas após a retirada do etanol ($N=6$ /grupo/experimento). Médias na vertical com letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

6/Grupo	Soma (CO + LC) – Média \pm DP
Água	171,1 \pm 39,4 A
Etanol	170,7 \pm 43,2 A
Retirada	283,2 \pm 34,3 B

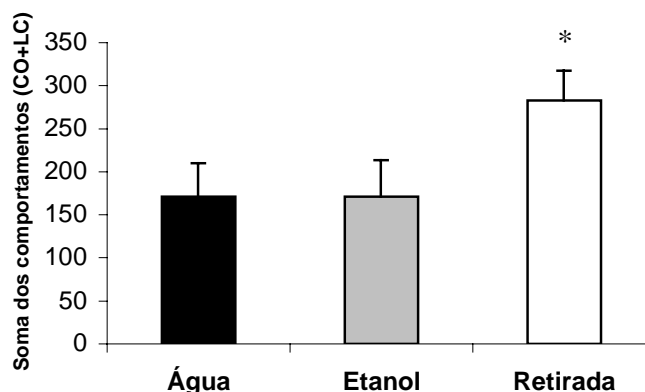


Figura 6. Soma dos comportamentos nociceptivos ao teste da formalina na ATM após 10 dias de ingestão de água ($N=6$) etanol ($N=6$) ou 12 horas após a retirada do etanol ($N=6$). Cada coluna representa a média \pm DP. * indica diferença estatística significativa entre o grupo da retirada (VII) e os outros 2 grupos ($p<0,05$, One-Way ANOVA + Tukey).

5.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA SOBRE A SOMA DOS COMPORTAMENTOS NOCICEPTIVOS EM ANIMAIS PREVIAMENTE TRATADOS COM ETANOL (TESTE DE TOLERÂNCIA CRUZADA)

Não houve diferença estatística entre os grupos que ingeriram água ou etanol em relação à potência analgésica da morfina, indicando que não houve desenvolvimento de tolerância cruzada entre a analgesia induzida pelo etanol e pela morfina. Só houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com morfina quando comparados com seus respectivos grupos controle ($p<0,001$, One-way ANOVA + Tukey; Tabela 7 e Figura 7).

TABELA 7. Efeito da morfina sobre a soma dos comportamentos nociceptivos (média \pm DP). Médias na vertical com letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

Grupos	Formalina 1,5%	Morfina 10mg/Kg + Formalina 1,5%	N
Água	171,1 \pm 39,3 A	14,0 \pm 19,7 B	6
Etanol	170,7 \pm 43,2 A	14,3 \pm 10,8 B	6

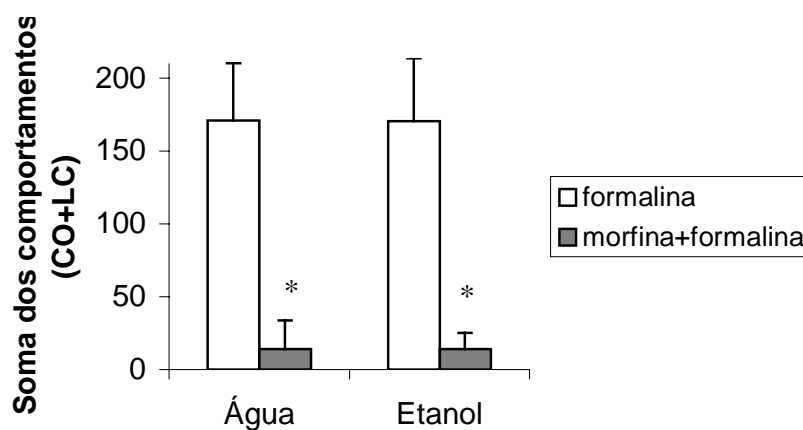


Figura 7. Efeito da morfina (10 mg/Kg) sobre a soma dos comportamentos nociceptivos no teste da formalina na ATM. Cada coluna representa a média \pm DP. * indica diferença estatística significante entre os grupos tratados com morfina (VIII e IX) e seus respectivos grupos controle ($p < 0,001$, One-way ANOVA + Tukey).

6 DISCUSSÃO

Alterações na percepção da dor podem ser produzidas por manipulações farmacológicas e/ou ambientais (Bell *et al.*, 1998). Os resultados do presente estudo (Gameiro *et al.*, 2003) mostraram que a administração aguda e crônica de etanol produziu um grau significativo de analgesia nos animais submetidos ao teste da formalina na ATM. Entretanto, após algum tempo de ingestão de etanol (dia 10) foi observada tolerância aos efeitos antinociceptivos do etanol. Em acréscimo, hiperalgesia comportamental foi verificada 12 horas após a retirada do regime crônico de etanol por 10 dias. Estes achados são consistentes com o estudo de Gatch & Lal (1999), que relataram os efeitos do etanol sobre um ensaio de dor superficial, o teste da retirada da cauda (*tail-flick*).

Bell *et al.* 1998 demonstraram que apenas uma injeção de etanol (2,5 g/Kg) era capaz de provocar analgesia significativa em ratos submetidos ao teste da placa quente (*hot-plate*). Os autores também demonstraram que ratos pré-tratados com etanol (tanto por injeções como por ingestão) desenvolveram tolerância à analgesia-induzida pelo etanol, a qual não era acompanhada por tolerância cruzada à analgesia induzida pela morfina, por isso sugeriram que os efeitos analgésicos do etanol eram mediados por mecanismos não opióides. No nosso estudo também não foi observada tolerância cruzada entre a analgesia induzida pelo etanol e pela morfina, o que indica que a ação analgésica do etanol sobre o teste da formalina na ATM é mediada principalmente por mecanismos não opióides.

Algumas pesquisas têm mostrado que a tolerância aos efeitos analgésicos do etanol ocorrerá apenas em certas condições, isto é, os procedimentos para avaliação da dor em ratos devem ser repetidamente realizados no mesmo ambiente que foi utilizado para induzir a tolerância (Jorgensen & Hole 1984; Siegel & Sdao-Jarvie, 1986; Le *et al.*, 1999). Esta é a chamada tolerância comportamental. Os nossos resultados mostraram que a tolerância à analgesia induzida pelo etanol foi provocada principalmente por fatores farmacológicos (tolerância fisiológica), pois os procedimentos utilizados para induzir tolerância foram realizados nas gaiolas dos ratos (administração de líquidos) e o teste da formalina foi realizado em outra sala experimental, demonstrando que a tolerância se

desenvolveu na ausência de “fatores ambientais”, tais como a manipulação, injeções e ambiente experimental.

Os mecanismos pelos quais o etanol produz analgesia ainda não estão claros; de fato, vários mecanismos podem estar envolvidos. Tem sido demonstrado que o etanol possui propriedades antagônicas sobre receptores excitatórios NMDA (Lovinger *et al.*, 1989) e ATP (Xiong *et al.*, 2000) e propriedades agonistas sobre receptores inibitórios GIRK (Ikeda *et al.*, 2002), GABA (Mihic, 1999) e 5HT (Lovinger, 1999). Portanto, é possível supor que o etanol possa influenciar (inibir) a transmissão e percepção da sensação dolorosa. Porém o fato de que a ingestão crônica de etanol pode provocar tolerância, dependência física e síndrome de abstinência (O’Brien, 1996) torna mais difícil o estudo dos efeitos do etanol sobre os complexos sistemas de dor. Se esses efeitos se refletirem sobre os receptores envolvidos no processamento da resposta dolorosa, a ação analgésica do etanol poderá ser abolida, por tolerância, ou as respostas nociceptivas poderão ser acentuadas (hiperalgesia), no caso da dependência física e síndrome da abstinência.

A tolerância fisiológica é considerada uma alteração compensatória, ao nível celular, em resposta aos efeitos depressivos do etanol. Os principais receptores envolvidos com esse fenômeno são o NMDA e o GABA_A (Chandler *et al.*, 1998). Muitos estudos têm mostrado um aumento na atividade dos receptores NMDA (Grant *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1997) e uma diminuição na atividade dos receptores GABA_A (Morrow, 1995) após exposição crônica ao etanol. Segundo Chandlers *et al.* (1998), essas alterações não se devem às mudanças na densidade dos receptores. O aumento na atividade dos receptores NMDA (up-regulation) e a diminuição da atividade dos receptores GABA_A (down-regulation) ocorre pelo aumento e diminuição da expressão genética de algumas subunidades protéicas dos canais NMDA (Chen *et al.*, 1997) e GABA_A (Mhatre & Ticku, 1992), respectivamente. Dessa forma, sugere-se que as alterações estruturais nos receptores NMDA e GABA_A, provocadas pelo etanol, são capazes de intensificar a neurotransmissão excitatória mediada pelo glutamato e reduzir a neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA. Portanto, essas modificações estruturais compensatórias parecem ser responsáveis pelas alterações no processo de nocicepção decorrentes da ingestão crônica e da retirada do etanol, conforme ilustrado nas Figuras 8, 9 e 10. O consumo freqüente de etanol pode

provocar tolerância aos seus efeitos analgésicos, conforme os resultados obtidos no presente trabalho, e a retirada do etanol pode provocar hiperexcitabilidade nas transmissões nervosas relacionadas à nocicepção, o que justifica a hiperalgesia comportamental observada nos animais submetidos ao teste da formalina na ATM após a suspensão do regime crônico de etanol.

Situação 1) Ação analgésica do etanol

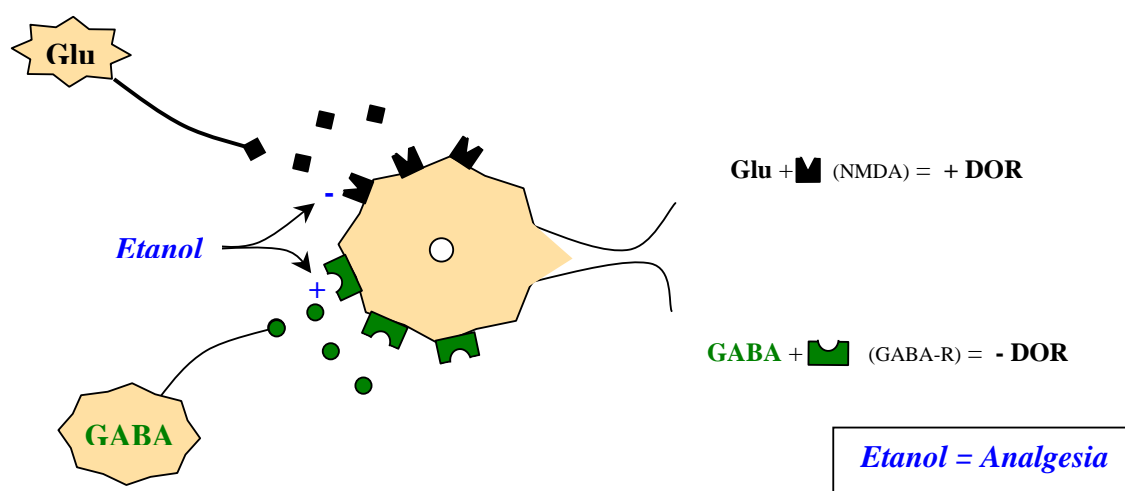


Figura 8 – Efeitos dos neurotransmissores GLUTAMATO (Glu), ácido γ-amino butírico (GABA) e do etanol sobre os receptores NMDA e GABA.

Situação 2) Desenvolvimento de tolerância

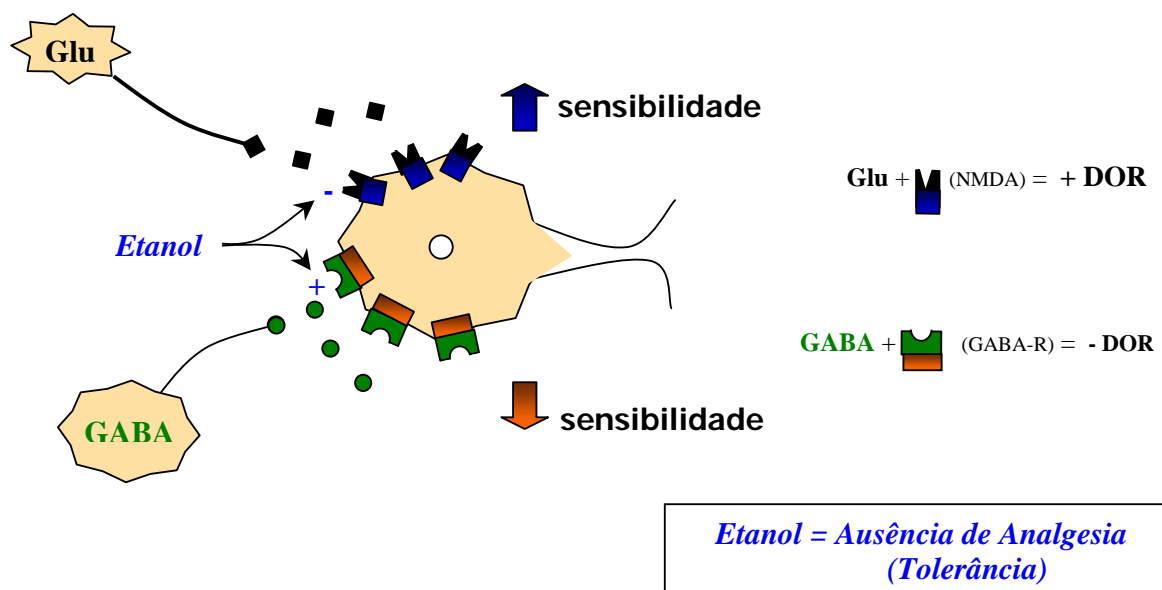


FIGURA 9 – O etanol provoca aumento na atividade (up-regulation) dos receptores NMDA e diminuição na atividade (down-regulation) dos receptores GABA. Nesta situação, o organismo está em “equilíbrio” com o etanol.

Situação 3) Efeito da retirada do etanol

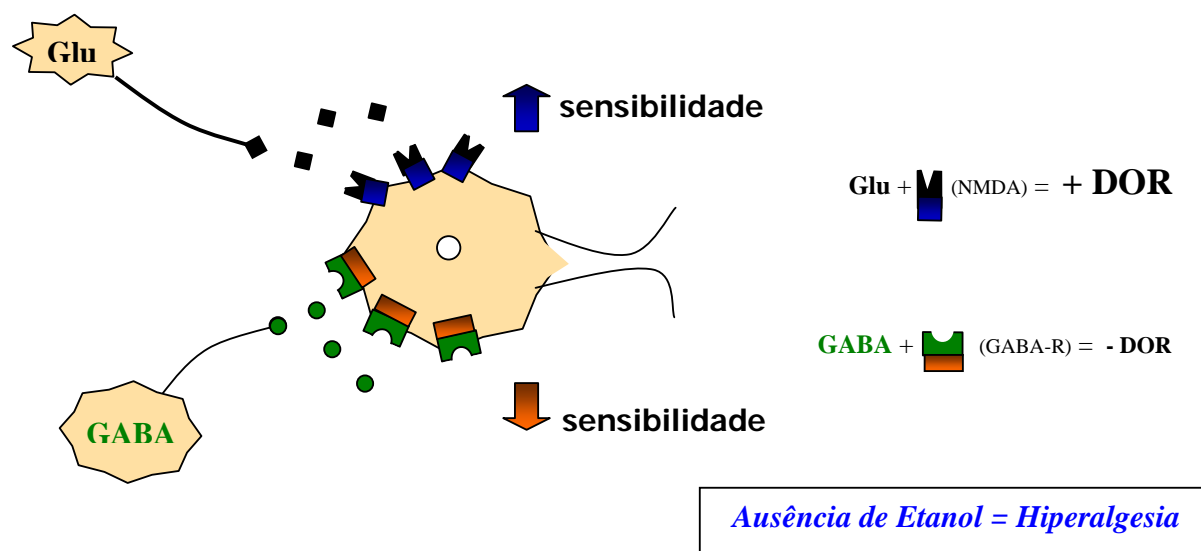


Figura 10 – As alterações estruturais provocadas nos receptores NMDA e GABA resultam em aumento na sensibilidade nociceptiva após a remoção do etanol (síndrome da abstinência).

De acordo com os mecanismos descritos acima, o etanol pode inicialmente produzir analgesia, porém a ingestão crônica pode provocar tolerância a esse efeito analgésico, e a retirada do etanol pode provocar respostas exageradas a estímulos que normalmente são dolorosos (hiperalgesia) devido à dependência física. Nossos resultados suportam essas teorias, visto que a administração aguda e crônica de etanol produziu um grau significativo de analgesia nos ratos submetidos ao teste da formalina na ATM. Além disso, esse efeito analgésico não ocorreu nos animais que ingeriram etanol por um período mais longo (10 dias), mostrando o desenvolvimento de tolerância aos efeitos antinociceptivos do etanol. Hiperálgia comportamental foi observada 12 horas após a retirada do etanol (administrado por 10 dias).

Nos testes com a morfina, foi observado que a dose de 10 mg/Kg (Bell *et al.*, 1998) teve um forte efeito analgésico sobre os comportamentos nociceptivos provocados pelo teste da formalina na ATM. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a potência analgésica da morfina nos ratos que ingeriram água (controle) e etanol por 10 dias, demonstrando que a tolerância aos efeitos do etanol que foi observada no dia 10 não foi

acompanhada por tolerância cruzada aos efeitos analgésicos da morfina. Por isso, sugerimos que a ação do etanol sobre o comportamento nociceptivo provocado pela formalina é mediada principalmente por mecanismos não-opioides. Nossos dados estão de acordo com o estudo de Bell *et al.*, (1998), que avaliaram a analgesia induzida pelo etanol e pela morfina utilizando o teste da placa quente (*hot-plate*) em ratos. Por outro lado, nossos resultados são diferentes daqueles encontrados por Shah *et al.* (1996) e Duttaroy *et al.*, (1997), que demonstraram que existia uma interação entre o etanol e a morfina. Porém, estes estudos utilizaram camundongos em seus experimentos e ensaios nociceptivos em tecidos superficiais, o que pode explicar as discrepâncias encontradas.

Embora o exato mecanismo de ação do etanol sobre os sistemas de processamento da dor não tenha sido comprovado, foi demonstrada no presente trabalho a influência do etanol sobre as condições dolorosas envolvendo tecidos profundos, como a ATM, utilizando-se o teste da formalina na ATM.

O teste da formalina (Dubuisson & Dennis, 1977; Roveroni *et al.*, 2001) é comumente utilizado como modelo de dor inflamatória e tônica. Como o teste provoca uma resposta dolorosa de longa duração, este é mais relevante para a avaliação da dor clínica e é mais sensível ao efeito de drogas analgésicas, quando comparado com modelos de dor física, tais como a placa quente e o teste da retirada da cauda (Hammond, 1989).

Informações sobre a extensão das alterações induzidas pelo etanol nos sistemas nociceptivos podem ser de grande valor clínico, especialmente para indivíduos que consomem álcool regularmente e que sofrem de algum tipo de condição dolorosa crônica, como as desordens temporomandibulares. Se a ingestão crônica de etanol ou a dependência física alteram os limiares nociceptivos, os efeitos das medicações analgésicas em alcoólatras podem ser significativamente alterados, podendo levar ao uso inadequado de medicamentos com perigosos efeitos colaterais ou a necessidade de intensificação da terapia analgésica para os casos de pacientes que sofrem os efeitos da síndrome de abstinência alcoólica.

7 CONCLUSÃO

- Este estudo demonstrou que o etanol é capaz de influenciar as respostas comportamentais de dor provocadas pelo teste da formalina na ATM.
- A administração aguda (2,5 g/Kg i.p.) e crônica (ingestão por 4 dias) produziu analgesia significativa nos animais submetidos ao teste da formalina na ATM.
- A ingestão prolongada (10 dias) provocou o desenvolvimento de tolerância aos efeitos analgésicos do etanol.
- A retirada do etanol provocou hiperalgesia comportamental durante o teste da formalina na ATM.
- A ausência de tolerância cruzada entre o etanol e a morfina sugere que os sistemas de ação analgésica do etanol são mediados por mecanismos não-opioides.

REFERÊNCIAS*

- Aghabeigi B. The pathophysiology of pain. *Br Dent J*. 1992; 173(3): 91-7.
- Bass MB, Friedman HJ, Lester D. Antagonism of naloxone hyperalgesia by ethanol. *Life Sci*. 1978; 22(21): 1939-1946.
- Bell RL, Olson RD, Vaccarino AL. Tolerance to ethanol analgesia is not accompanied by cross-tolerance to morphine analgesia in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998; 59(1): 123-7.
- Brick J, Sun JY, Davis L, Pohorecky LA. Ethanol and the response to electric shock in rats. *Life Sci*. 1976; 18(11): 1293-1298.
- Burkey RT, Nation JR, Bratton GR. Chronic lead exposure attenuates ethanol-induced hypoalgesia. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994; 47(2): 227-31.
- Chiang CY, Hu B, Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ. Central sensitization of nociceptive neurons in trigeminal subnucleus oralis depends on integrity of subnucleus caudalis. *J Neurophysiol*. 2002; 88(1): 256-64.
- Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain*. 1993; 52(3): 259-85.
- Cook SP, McCleskey EW. Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain*. 2002; 95(1-2): 41-7.
- Craig AD, Bushnell MC. The thermal grill illusion: unmasking the burn of cold pain. *Science*. 1994; 265(5169): 252-5.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Cutter HS, O'Farrell TJ. Experience with alcohol and the endogenous opioid system in ethanol analgesia. *Addict Behav.* 1987; 12(4): 331-43.

Deitrich RA, Dunwiddie TV, Harris RA, Erwin VG. Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. *Pharmacol Rev.* 1989; 41(4): 489-537.

Doremus TL, Brunell SC, Varlinskaya EI, Spear LP. Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003; 75(2): 411-8.

Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth.* 1995; 75(2): 125-31.

Dubner R. Neurophysiology of pain. *Dent Clin North Am.* 1978; 22(1): 11-30.

Dubner R, Basbaum AI. Spinal dorsal horn plasticity following tissue or nerve injury. In: Wall PD, Melzack R, editors. *Textbook of Pain*. 3. ed. London: Churchill Livingstone, 1994: 225-241.

Duttaroy A, Gregorio G, Shah S, Shen J, Philippe J, Monderson T, Yoburn BC. Acute ethanol exposure decreases the analgesic potency of morphine in mice. *Life Sci.* 1998; 62(2): 35-41.

Fadda F, Rossetti ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol.* 1998; 56(4): 385-431.

Fidecka S, Tamborska E, Malec D, Langwinski R. The development of cross tolerance between ethanol and morphine. *Pol J Pharmacol Pharm.* 1986; 38(3): 277-84.

Franklin KB, Abbott FV. Pentobarbital, diazepam, and ethanol abolish the interphase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABA_A receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993; 46(3): 661-6.

Friedman H, Bass M, Lester D. Ethanol-induced analgesia in rats selectively bred for ethanol sensitivity. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980; 13(6): 773-776.

Fritschy JM, Brunig I. Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther.* 2003; 98(3): 299-323.

Galduróz JC *et al.* 1997 in *Apud* BRASIL. Ministério da Saúde. *Programas e Projetos: saúde mental – criar diretrizes que normalizem a assistência e dependência química.* Disponível em:

<http://www.saude.gov.br/Programas/mental/criar.htm#not4> . Acesso em: 22 maio 2002.

Gameiro GH, Arthuri MT, Tambeli CH, de Arruda Veiga MC. Effects of ethanol on deep pain evoked by formalin injected in TMJ of rat. *Life Sci.* 2003; 73(26): 3351-61.

Gatch MB, Lal H. Effects of ethanol and ethanol withdrawal on nociception in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999; 23(2): 328-33.

Gatch MB, Wallis CJ, Lal H. Effects of ritanserin on ethanol withdrawal-induced anxiety in rats. *Alcohol.* 2000; 21(1): 11-7.

Garraway SM, Hochman S. Serotonin increases the incidence of primary afferent-evoked long-term depression in rat deep dorsal horn neurons. *J Neurophysiol.* 2001; 85(5): 1864-72.

Gobel S, Hockfield S, Ruda MA. Anatomical similarities between medullary and spinal dorsal horns, In: *Oral-Facial Sensory and Motor Functions.* Kawamura Y, Dubner R, editors. Tokyo: Quintessence; 1981. p. 211-223.

Hobbs WR, Rall TW, Verdoorn TA. Hipnóticos e sedativos;etanol. In: Goodman LS. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1996. p. 264-289.

Hoffman PL, Rabe CS, Moses F, Tabakoff B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J Neurochem*. 1989; 52(6): 1937-40.

Holloway FA, Miller JM, King DA, Bedingfield JB. Delayed ethanol effects on physiological and behavioral indices in the rat. *Alcohol*. 1993; 10(6): 511-9.

Hu B, Chiang CY, Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ. P2X receptors in trigeminal subnucleus caudalis modulate central sensitization in trigeminal subnucleus oralis. *J Neurophysiol*. 2002; 88(4): 1614-24.

Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, Yano R, Sora I, Niki H. Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys? *Neurosci Res*. 2002; 44(2): 121-131.

Iwata K, Tashiro A, Tsuboi Y, Imai T, Sumino R, Morimoto T, Dubner R, Ren K. Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol*. 1999; 82(3): 1244-53.

Jorgensen HA, Hole K. Does ethanol stimulate brain opiate receptors? Studies on receptor binding and naloxone inhibition of ethanol-induced effects. *Eur J Pharmacol*. 1981; 75(4): 223-9.

Kosten TA, Bombace JC. Ethanol enhances naloxone sensitization and disrupts morphine discrimination--comparison to dizocilpine and pentobarbital: explanation of enhancing acute and attenuating chronic effects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2001; 25(6): 1283-306.

Le Bars D, Adam F. Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2002; 21(4): 315-35.

Li C, Peoples RW, Weight FF. Alcohol action on a neuronal membrane receptor: evidence for a direct interaction with the receptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(17): 8200-4.

Lovinger DM. 5-HT₃ receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic. *Neurochem Int.* 1999; 35(2): 125-30.

Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science.* 1989; 243(4899): 1721-4.

Lund JP, Lavigne GJ, Dubner R, Sessle BJ. *Dor Orofacial: Da ciência básica à conduta clínica.* São Paulo: Quintessence Editora Ltda; 2002.

Mihic SJ. Acute effects of ethanol on GABA_A and glycine receptor function. *Neurochem Int.* 1999; 35(2): 115-23.

Mogil JS, Sternberg WF, Kest B, Marek P, Liebeskind JC. Sex differences in the antagonism of swim stress-induced analgesia: effects of gonadectomy and estrogen replacement. *Pain.* 1993; 53(1): 17-25.

O'Brien CP. Dependência e uso abusivo de drogas. In: Goodman LS. *As bases farmacológicas da terapêutica.* 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1996. p.405-420.

Peoples RW, Li C, Weight FF. Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996. 36: 185-201.

Pohorecky LA, Shah P. Ethanol-induced analgesia. *Life Sci.* 1987; 41(10): 1289-95.

Roveroni RC, Parada CA, Cecilia M, Veiga FA, Tambeli CH. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain*. 2001; 94(2): 185-91.

Schuckit MA. Drug and Alcohol Abuse: *A Clinical Guide to Diagnosis and Treatment*, 3.ed. Plenum Press, New York, 1989. *Apud* O'Brien CP. Dependência e uso abusivo de drogas. In: Goodman LS. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1996. p. 405-420.

Seo K, Hu JW, Cairns BE, Someya G. Involvement of GABA(A) receptor in modulation of jaw muscle activity evoked by mustard oil application to the rat temporomandibular joint. *Brain Res*. 2001; 892(1): 198-202.

Sessle BJ. Recent developments in pain research: central mechanisms of orofacial pain and its control. *J Endod*. 1986; 12(10): 435-44.

Sessle BJ. Brainstem mechanisms underlying craniofacial pain and its modulation. *Adv Pain Res Ther*. 1995. 22: 413-421.

Sessle BJ. Mechanism of trigeminal and occipital pain. *Pain Rev*. 1996; 3:91-116.

Sessle BJ. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11(1):57-91.

Sessle BJ. Recent insights into brainstem mechanisms underlying craniofacial pain. *J Dent Educ*. 2002; 66(1): 108-12.

Sessle BJ, Hu JW. Mechanisms of pain arising from articular tissues. *Can. J. Physiol. Pharm*. 1991; 69(5): 617-626.

Shah S, Duttaroy A, Sehba F, Chen B, Philippe J, Monderson T *et al.* .The effect of ethanol drinking on opioid analgesia and receptors in mice. *Alcohol*. 1997; 14(4): 361-6.

Swift JQ, Roszkowski MT, Alton T, Hargreaves KM. Effect of intra-articular versus systemic anti-inflammatory drugs in a rabbit model of temporomandibular joint inflammation. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998; 56(11): 1288-95.

Tecott LH, Maricq AV, Julius D. Nervous system distribution of the serotonin 5-HT₃ receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(4): 1430-4.

Tsai CM, Chiang CY, Yu XM, Sessle BJ. Involvement of trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) in craniofacial nociceptive reflex activity. *Pain*. 1999; 81(1-2): 115-28.

Vaillant GE. *A história natural do alcoolismo revisitada*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda; 1999.

Weight FF, Li C, Peoples RW. Alcohol action on membrane ion channels gated by extracellular ATP (P2X receptors). *Neurochem Int*. 1999; 35(2): 143-52.

Wolff HG, Hardy JD, Goodell H. Studies on pain: Measurement of the effect of ethyl alcohol on the pain threshold and on the “alarm” reaction. *J Pharmacol Exp Ther*. 1942. 75: 38-49.

Woodrow KM, Eltherington LG. Feeling no pain: alcohol as an analgesic. *Pain*. 1988 Feb;32(2):159-63. Erratum in: *Pain* 1991; 46(3): 343.

Woolf CJ. Windup and central sensitization are not equivalent. *Pain*. 1996; 66(2-3): 105-8.

Woolf CJ, Thompson SW. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*. 1991; 44(3): 293-9.

Xiong K, Li C, Weight FF. Inhibition by ethanol of rat P2X(4) receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol*. 2000; 130(6): 1394-8.

Yaksh TL. Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain*. 1989; 37(1): 111-23.

Yirmiya R, Taylor NA. Genetic differences in opiate receptor concentration and sensitivity to ethanol's effects. *Pharmacol Biochem Behav*. 1989; 33(4): 793-796.

Yu XM, Sessle BJ, Haas DA, Izzo A, Vernon H, Hu JW. Involvement of NMDA receptor mechanisms in jaw electromyographic activity and plasma extravasation induced by inflammatory irritant application to temporomandibular joint region of rats. *Pain*. 1996; 68(1): 169-78.

Yu XM, Sessle BJ, Hu JW. Differential effects of cutaneous and deep application of inflammatory irritant on mechanoreceptive field properties of trigeminal brain stem nociceptive neurons. *J Neurophysiol*. 1993; 70(4): 1704-1707.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10.

ANEXOS – ANEXO 1



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEa-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 371-1, sobre "Efeito do etanol sobre a sensibilidade dolorosa ao teste da formalina na ATM de ratos"

sob a responsabilidade de Cláudia H. Tambeli, Maria Cecília F.A. Veiga e Gustavo H. Gameiro está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)-IB-UNICAMP em reunião de 03/05/2002.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 371-1, entitled "Ethanol effect on pain sensitivity in rats TMJ formalin test"

is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 03/05/2002
(d) (m) (y)

Campinas, 03 de Maio de 2002

Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito
Presidente - CEEa/IB/UNICAMP

Prof. Dr. Armando Ferreira Lima
Secretário - CEEa/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEPHERINO VAZ
CEP - 13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 3788/116
FAX 55 19 32893124

APÊNDICE

Tabelas referentes aos valores individuais da amostra.

Tabela 1 – Valores individuais do efeito desencadeado pela administração de etanol (2,5 g/Kg) ou salina sobre os comportamentos nociceptivos (CO + LC) desencadeados pela injeção de formalina na ATM.

Soma dos comportamentos (CO + LC)		
Animal	Grupo Salina (Controle)	Grupo Etanol
1	198,68	56,15
2	195,14	119,25
3	208,13	117,00
4	295,84	145,86
5	275,58	155,99
6	194,64	101,00
Média ± DP	228 ± 45,41	115,87 ± 35,52

Tabela 2 – Valores individuais do efeito desencadeado pela ingestão crônica de etanol (6,5% por 4 dias) ou água comum sobre os comportamentos nociceptivos (CO + LC) desencadeados pela injeção de formalina na ATM.

Soma dos comportamentos (CO + LC)		
Animal	Grupo Água (Controle)	Grupo Etanol
1	202,39	128,47
2	148,14	171,36
3	245,33	172,65
4	253,77	111,32
5	248,29	95,25
6	219,00	55,15
Média ± DP	219,48 ± 40,13	122,36 ± 45,47

Tabela 3 – Valores individuais do efeito desencadeado pela ingestão crônica de etanol (6,5% por 10 dias) ou água comum sobre os comportamentos nociceptivos (CO + LC) desencadeados pela injeção de formalina na ATM.

Soma dos comportamentos (CO + LC)		
Animal	Grupo Água (Controle)	Grupo Etanol
1	145,41	147,56
2	131,90	156,70
3	208,80	227,73
4	188,09	110,18
5	132,85	211,46
6	219,40	170,67
Média ± DP	171,07 ± 39,24	170,71 ± 43,14

Tabela 4 – Valores individuais do efeito desencadeado pela ingestão crônica de etanol (6,5% por 10 dias), água comum ou da retirada do etanol sobre os comportamentos nociceptivos (CO + LC) desencadeados pela injeção de formalina na ATM.

Soma dos comportamentos (CO + LC)			
Animal	Grupo Água (Controle)	Grupo Etanol	Grupo Retirada
1	145,41	147,56	287,21
2	131,90	156,70	338,91
3	208,80	227,73	243,33
4	188,09	110,18	289,41
5	132,85	211,46	250,28
6	219,40	170,67	290,11
Média ± DP	171,07 ± 39,24	170,71 ± 43,14	283,20 ± 34,29

Tabela 5 – Valores individuais do efeito desencadeado pela administração de morfina (10 mg/Kg) sobre os comportamentos nociceptivos (CO + LC) desencadeados pela injeção de formalina na ATM em animais que ingeriram água comum ou etanol 6,5% por 10 dias.

Soma dos comportamentos (CO + LC)				
Animal	Grupo Água		Grupo Etanol	
	formalina	formalina + morfina	formalina	formalina + morfina
1	145,41	6,00	147,56	15,00
2	131,90	9,00	156,70	18,21
3	208,80	2,00	227,73	30,00
4	188,09	53,88	110,18	2,00
5	132,85	6,00	211,46	18,53
6	219,40	6,91	170,67	2,00
Média ± DP	171,07 ± 39,24	13,965 ± 19,686	170,71 ± 43,14	14,290 ± 10,796